

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan salah satu jenis senyawa reaktif yang biasa dikenal dengan senyawa dengan elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya (Winarsi, 2007). C (Prabowo, 2009; Salamah *et al*, 2008). Radikal bebas dapat dilawan atau dikurangi dengan pemberian atau penggunaan antioksidan (Salimi, 2005). Antioksidan adalah senyawa yang menyumbangkan elektron (donor elektron) atau zat pereduksi. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidatif dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga kerusakan sel akan dihambat (Sunardi, 2007). Rumput laut berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber antioksidan alami. Alga cokelat (*P. australis*) merupakan salah satu jenis alga cokelat yang ekstraknya mengandung senyawa metabolik sekunder seperti fenolik (Yuguchi *et al.* 2016) yang berpotensi sebagai antioksidan (Sachindra *et al.* 2007). Selain senyawa fenolik yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan, senyawa xanthophyll yang dikenal dengan nama fucoxanthin juga memiliki aktivitas antioksidan (D'Orazio *et al.* 2012).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak alga coklat *Padina* dengan pelarut metanol memiliki nilai IC_{50} 37,68 ppm (Husni, 2014) . Alga coklat jenis lain seperti ekstrak *Sargassum* menggunakan pelarut etanol memiliki nilai IC_{50} 5,86 ppm (Kamoda, 2021), dan ekstrak alga coklat jenis *Turbinaria* dengan pelarut metanol memiliki nilai IC_{50} 220 ppm (Rohimat *et al*, 2014). Suatu senyawa dikatakan antioksidan sangat aktif jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, dan antioksidan aktif jika nilai IC_{50} antara 50 dan 100 ppm. Sebaliknya, jika nilai IC_{50} antara 101 dan 250 ppm maka senyawa tersebut tergolong antioksidan lemah IC_{50} adalah 250-500 ppm. Alga coklat *Padina* memiliki aktivitas antioksidan sangat aktif karena memiliki nilai IC_{50} dibawah 50 ppm (Kore *et al*, 2019).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas senyawa antioksidan terhadap radikal seperti DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), dan FRAP (*ferric ion reducing antioxidant potential*). Metode DPPH merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan suatu sampel yang diuji dengan memeriksa kemampuan sampel dalam menetralsir radikal bebas DPPH. Kelebihan metode DPPH adalah sederhana, mudah, cepat, sensitif, dan memerlukan jumlah sampel yang sedikit. Penggunaannya mudah karena senyawa radikal DPPH yang digunakan relatif stabil dibandingkan metode *i et al.* 2015).

ng terdapat di dalam *P.australis* salah satunya fucoxanthin karotenoid utama dan bersifat polar, pelarut organik polar untuk ekstraksi alga coklat, karena efisiensi proses ekstraksi n oleh struktur kimia setiap karotenoid yang ada dalam *al*, 2001). Beberapa pelarut organik polar telah digunakan



untuk mengekstrak *fucoxanthin* dari alga coklat, antara lain: Aseton (Hegazi *et al.* 1998; Limantara & Heriyanto, 2010), aseton-metanol (Haugan *et al.* 1992; Haugan) & Liaaen-Jensen, 1992), etanol (Kanazawa *et al.* 2008; Roh *et al.* 2008), metanol (Kanazawa *et al.* 2008), dan DMSO (Seely *et al.* 1972; Wang *et al.* 2005). Fraksinasi salah satunya dapat menggunakan pelarut yang berbeda berdasarkan derajat polaritasnya menghasilkan ekstrak alami yang berbeda dan menjamin daya tarik maksimum senyawa metabolit sekunder terhadap pelarut (Mulyawati *et al.* 2016).

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan hasil fraksinasi *Padina australis* terhadap radikal DPPH.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak dan hasil fraksinasi alga coklat *Padina australis* terhadap radikal DPPH.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan hasil fraksinasi alga coklat *Padina australis* terhadap radikal DPPH.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, alu ayakan, cawan porselen, corong, gelas ukur, kuvet, gelas beker, labu ukur, lumping, ELISA reader, spektrofotometer UV-Vis, dan timbangan analitik.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alga cokelat (*Padina australis*), aluminium foil, baku pembanding serbuk asam askorbat, DPPH, etil asetat, metanol PA, dan n-heksan.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pengumpulan dan Penyiapan Sampel

2.2.1.1 Pengumpulan Sampel

Sampel Alga cokelat (*Padina australis*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perairan Punaga Takalar, Sulawesi Selatan.

2.2.1.2 Penyiapan Sampel

Sampel yang telah dikumpulkan selanjutnya dipreparasi sesuai prosedur penyiapan simplisia yakni disortasi basah lalu dicuci menggunakan air mengalir guna menghilangkan kontaminan. Selanjutnya sampel dikeringkan dibawah sinar matahari lalu disortasi kering. Sampel kering kemudian diserbukkan dan disimpan pada wadah kedap udara

2.2.2 Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi

2.2.2.1 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia sebanyak 100 g dimasukkan ke dalam gelas kimia dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menambahkan metanol sebanyak 1 liter. Simplisia didiamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Pisahkan filtratnya dengan menggunakan kertas saring. Residu yang dihasilkan dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama, proses dilakukan selama 3 x 24 jam, dan hasil maserat kemudian ditampung dalam wadah. Ekstrak cair yang dihasilkan dipekatkan pada rotary evaporator pada suhu 60°C. Dengan cara ini, ekstrak pekat atau kasar diperoleh untuk fraksinasi.

2.2.2.2 Fraksinasi



difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum. Ekstrak encampurkan 1 g ekstrak dengan 1 g silika gel. Kolom diisi gel dan dilewatkan dengan *n*-heksana hingga silika gel merata. Ekstrak yang sudah dikondisikan dimasukkan ke dalam kolom secara merata pada silika gel. Kemudian dilewatkan dengan *n*-100:0; 90:20; 80: 20; 50:50; 20:80; dan etanol 100% masing-masing fraksi yang diperoleh dianalisis dengan KLT dengan eluen *n*-

heksana: etil asetat (2: 1) dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Fraksi-fraksi dengan skor Rf yang sama digabungkan dan digunakan untuk analisis lebih lanjut.

2.2.3 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH

2.2.3.1 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak dan Hasil Fraksinasi

Larutan stok ekstrak *P.australis* dengan konsentrasi 1000 µg/ml dibuat dengan cara menimbang 50 mg ekstrak pekat dengan saksama dan melarutkannya dengan etanol hingga 50 ml dalam labu takar. Setiap fraksi juga ditimbang hingga 50 mg dan dilarutkan dengan etanol hingga 50 ml dalam labu takar.

2.2.3.2 Pembuatan Larutan Pembanding

Larutan stok asam askorbat dengan konsentrasi 1000 µg/ml dibuat dengan cara menimbang dengan saksama 10 mg asam askorbat lalu dilarutkan dengan 10 mL etanol dalam labu tentukur.

2.2.3.3 Pembuatan Larutan Stok DPPH

Serbuk DPPH ditimbang hingga 40 mg kemudian dilarutkan dalam 25 mL etanol sambil diaduk hingga larut. Kemudian ambil 1 mL larutan DPPH, tambahkan etanol hingga menjadi 5 mL dan biarkan selama 30 menit.

2.2.3.4 Pembuatan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Gunakan pipet untuk mengambil 1 mL larutan, kemudian tambahkan 5 mL larutan etanol dan ukur serapannya di antara 400-600 nm.

2.2.3.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Radikal DPPH dengan Asam Askorbat dan Larutan Uji

Larutan pembanding asam askorbat, ekstrak, fraksi, dan blanko dibuat dengan mengambil sampel larutan stok seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1, 2, 3, dan 4. Metanol kemudian ditambahkan ke masing-masing seperti yang ditunjukkan pada tabel yang sama. Setiap larutan dilakukan dalam 3 replikasi pada *Micro Plate 96-Well plate* (Acharya, *et al*, 2017). Larutan uji kemudian ditambahkan ke setiap larutan sebanyak 50 µL dan kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi kemudian diukur menggunakan instrumen ElisaReader pada 516 nm.



Tabel 1 . Perbandingan volume larutan asam askorbat, pelarut, dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Volum e Asam Askorbat Askorbat (μL)	Volum e Metanol (μL)	Volum e Radikal (μL)
Kontrol Pelarut (KP)	-	200	-
Blangko (B)	-	150	50
2	4	146	50
4	8	142	50
6	12	138	50
8	16	134	50
10	20	130	50

Tabel 2. Perbandingan volume larutan ekstrak, fraksi 1, fraksi 4, fraksi 5, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Volum e Sampel Uji (μL)	Volum e Metanol (μL)	Volum e Radikal (μL)
Kontrol Pelarut (KP)	-	200	-
Blangko (B)	-	150	50
150	30	120	50
300	60	90	50
450	90	60	50
600	120	30	50
750	150	0	50

Tabel 3. Perbandingan volume larutan fraksi 2, fraksi 3, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Volum e Sampel Uji (μL)	Volum e Metanol (μL)	Volum e Radikal (μL)
Kontrol Pelarut (KP)	-	200	-
	-	150	50
	10	140	50
	20	130	50
	30	120	50
	40	110	50
	50	100	50



2.2.3.7 Penentuan Persen Inhibisi

Persen Inhibisi menggambarkan kemampuan antioksidan dalam menangkal radikal bebas dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\%$$

Keterangan : A_b = Absorbansi Blanko
 A_s = Absorbansi Sampel

2.2.3.8 Penentuan Nilai IC_{50} (Inhibitory Concentration)

Konsentrasi sampel dan nilai probit dari persen inhibisi diplot masing-masing pada sumbu x dan y untuk mendapatkan persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} .

